

(19)日本国特許庁 (JP)

(12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平5-115281

(43)公開日 平成5年(1993)5月14日

(51)Int.Cl. ⁵	識別記号	府内整理番号	F I	技術表示箇所
C 1 2 N 9/06	ZNA B	7823-4B		
1/21		7236-4B		
15/53				
// C 1 2 Q 1/26		6807-4B		
(C 1 2 N 9/06				

審査請求 未請求 請求項の数10(全 12 頁) 最終頁に続く

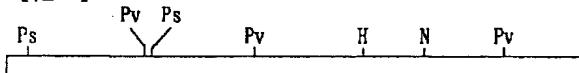
(21)出願番号	特願平3-280126	(71)出願人	000004477 キツコーマン株式会社 千葉県野田市野田339番地
(22)出願日	平成3年(1991)10月25日	(71)出願人	000173935 財団法人野田産業科学研究所 千葉県野田市野田339番地
		(72)発明者	市川 利夫 千葉県野田市野田339番地 キツコーマン 株式会社内
		(72)発明者	鈴木 勝 千葉県野田市野田339番地 キツコーマン 株式会社内
		(74)代理人	弁理士 平木 祐輔 (外2名) 最終頁に続く

(54)【発明の名称】 新規なザルコシン・オキシダーゼM、その遺伝子、新規な組み換え体DNA及びザルコシン・オキシダーゼMの製造法

(57)【要約】

【構成】 パチルス属に属する微生物に由来し、下記の制限酵素開裂地図で規定される新規なザルコシン・オキシダーゼM遺伝子、該遺伝子から翻訳される新規なザルコシン・オキシダーゼM、該遺伝子をベクターDNAに挿入した新規な組み換え体DNA、及び該組み換え体DNAを含み、ザルコシン・オキシダーゼM生産能を有するエッシェリシア属に属する微生物を培地に培養してザルコシン・オキシダーゼMを製造する方法。

【化1】



(式中、PsはPst I、PvはPvu II、HはHind III、NはNru Iを表す。)

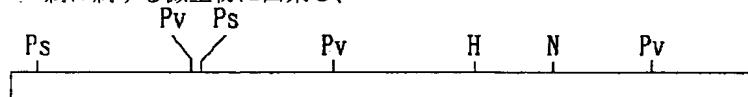
【効果】 高い基質特異性と熱安定性を有するザルコシン・オキシダーゼMを提供することができる。

1

【特許請求の範囲】

【請求項1】 配列表の配列番号1のアミノ酸配列で示される新規なザルコシン・オキシダーゼM。

【請求項2】 バチルス属に属する微生物に由来し、*



(式中、PsはPst I、PvはPvuII、HはHindIII、NはNruIを表す。)

【請求項3】 配列表の配列番号1のアミノ酸配列をコードする請求項2記載の新規なザルコシン・オキシダーゼM遺伝子。

【請求項4】 配列表の配列番号2の塩基配列で示される請求項2又は3記載の新規なザルコシン・オキシダーゼM遺伝子。

【請求項5】 請求項2記載の新規なザルコシン・オキシダーゼM遺伝子をベクターDNAに挿入したことを特徴とする新規な組み換え体DNA。

【請求項6】 ザルコシン・オキシダーゼM遺伝子が配列表の配列番号1のアミノ酸配列をコードすることを特徴とする請求項5記載の新規な組み換え体DNA。

【請求項7】 ザルコシン・オキシダーゼM遺伝子が配列表の配列番号2の塩基配列で示されることを特徴とする請求項5又は6記載の新規な組み換え体DNA。

【請求項8】 請求項5記載の新規な組み換え体DNAを含み、ザルコシン・オキシダーゼM生産能を有するエッショリシア属に属する微生物を培地に培養し、培養物よりザルコシン・オキシダーゼMを採取することを特徴とするザルコシン・オキシダーゼMの製造法。

【請求項9】 ザルコシン・オキシダーゼM遺伝子が※
クレアチニン+H₂O → クレアチニン
(クレアチニン・アミドヒドロラーゼ)
クレアチニン+H₂O → ザルコシン+尿素
(クレアチニン・アミジノヒドロラーゼ)
ザルコシン+H₂O+O₂ → グリシン+ホルムアルデヒド+H₂O
(ザルコシン・オキシダーゼ)

【0004】 従来、ザルコシン・オキシダーゼは、コリネバクテリウム属〔J. Biochem., 89, 599(1981)〕、バチルス属(特開昭54-52789号公報、特開昭61-162174号公報)、シリンドロカーボン属(特開昭56-92790号公報)、シュードモナス属(特開昭60-43379号公報)、アースロバクター属(特開平2-265478号公報)等の菌株により生産されることが知られている。しかしながら、熱安定性が悪く、ザルコシンに対するKm値が大きいもの、エチル・グリシンやプロリンにも大きく作用するなど特異性の劣る酵素であった。このエチル・グリシンやプロリンは、治療中の投薬由来によるもので、これにもザルコシン・オキシダーゼが作用すると正の測定誤差を与え、治療上問題となっている。

* 下記の制限酵素開裂地図で規定される新規なザルコシン・オキシダーゼM遺伝子。

【化1】

※配列表の配列番号1のアミノ酸配列をコードすることを特徴とする請求項8記載のザルコシン・オキシダーゼMの製造法。

【請求項10】 ザルコシン・オキシダーゼM遺伝子が配列表の配列番号2の塩基配列で示されることを特徴とする請求項8又は9記載のザルコシン・オキシダーゼMの製造法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】 本発明は、臨床医学分野において、腎臓疾患等の診断用酵素として用いるためのより好適な新規ザルコシン・オキシダーゼM、その遺伝子、新規な組み換え体DNA及びザルコシン・オキシダーゼMの製造法に関する。

【0002】

【従来の技術】 従来、臨床医学分野では、血清、尿中のクレアチニンあるいはクレアチニンを酵素定量法により測定し、腎臓機能の疾患、筋肉疾患等の診断を行なっている。その定量法は下記の通りであって、これにザルコシン・オキシダーゼが使用されている。なお、下記の式中、括弧内は使用酵素である。

30 【0003】

【化2】

クレアチニン+H₂O → クレアチニン
(クレアチニン・アミドヒドロラーゼ)
クレアチニン+H₂O → ザルコシン+尿素
(クレアチニン・アミジノヒドロラーゼ)
ザルコシン+H₂O+O₂ → グリシン+ホルムアルデヒド+H₂O
(ザルコシン・オキシダーゼ)

【0005】

【発明が解決しようとする課題】 上記したように、クレアチニンあるいはクレアチニンを、酵素的に定量する方法が用いられているが、血清、尿中に含まれているクレアチニン量あるいはクレアチニン量は極めて微量であるので、投薬由来の物質に作用すると測定値の信頼性が失われる。

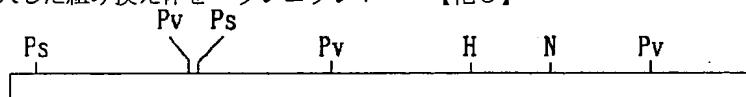
【0006】 従って、その定量に際しては、高感度で、しかも特異性の高い酵素的測定法が期待されている。また、定量に用いられる酵素としては、夾雜酵素を含まない純度の高い酵素が要求され、それを得るために酵素の多量精製工程において夾雜酵素(例えば、カタラーゼ、ウリカーゼ等)を加熱処理で完全に失活させるなどし

て、比活性の高い高純度の酵素とする必要がある。

【0007】

【課題を解決するための手段】上記した背景を踏まえ、本発明者等のうちの一人は、クレアチニンあるいはクレアチニンの高感度で特異性の高い酵素的測定法に好適な、熱に安定で、ザルコシンに対する特異性の高い酵素的性質を同時に所有する新規なザルコシン・オキシダーゼを提供すべく鋭意検討を重ねた結果、新たに土壌より分離したバチルス属に属する菌株〔バチルス・エスピー・KS-11A〔微工研条寄3605号〕〕を培養したものより、高い基質特異性と熱安定性を同時に有する新規なザルコシン・オキシダーゼMが得られることを知った。

【0008】また、本発明者等は、この新規ザルコシン・オキシダーゼMをコードする遺伝子を含有するDNAをベクターDNAに挿入した組み換え体をエッシェリシ*



【0011】(式中、PsはPstI、PvはPvuII、HはHindI II、NはNruIを表す。)であり、本発明の第3は、配列表の配列番号1のアミノ酸配列をコードし、配列表の配列番号2の塩基配列で示される新規なザルコシン・オキシダーゼM遺伝子であり、本発明の第4は、前記本発明の第2の新規なザルコシン・オキシダーゼM遺伝子をベクターDNAに挿入したことを特徴とする新規な組み換えDNAであり、本発明の第5は、配列表の配列番号1のアミノ酸配列をコードし、配列表の配列番号2の塩基配列で示される新規なザルコシン・オキシダーゼM遺伝子をベクターDNAに挿入したことを特徴とする新規な組み換えDNAであり、本発明の第6は、前記本発明の第2の新規なザルコシン・オキシダーゼM遺伝子をベクターDNAに挿入した新規な組み換えDNAを含み、ザルコシン・オキシダーゼM生産能を有するエッシェリシア属に属する微生物を培地に培養し、培養物よりザルコシン・オキシダーゼMを採取することを特徴とするザルコシン・オキシダーゼMの製造法であり、本発明の第7は、配列表の配列番号1のアミノ酸配列をコードし、配列表の配列番号2の塩基配列で示される新規なザルコシン・オキシダーゼM遺伝子をベクターDNAに挿入した新規な組み換えDNAを含み、ザルコシン・オキシダーゼM生産能を有するエッシェリシア属に属する微生物を培地に培養し、培養物よりザルコシン・オキ*

*ア (Escherichia) 属に属する菌株に含ませたザルコシン・オキシダーゼM生産能を有する菌株を創成することにより、培地中にクレアチニン、クレアチン及び／又はザルコシンを添加することなく、効率よくザルコシン・オキシダーゼMが生産されることを知り、更に、ザルコシン・オキシダーゼM遺伝子について検討した結果、この新規ザルコシン・オキシダーゼM遺伝子を初めて単離及び構造決定することに成功し、本発明を完成した。

【0009】即ち、本発明の第1は、配列表の配列番号1のアミノ酸配列で示される新規なザルコシン・オキシダーゼMであり、本発明の第2は、バチルス属に属する微生物に由来し、下記の制限酵素開裂地図で規定される新規なザルコシン・オキシダーゼM遺伝子

【0010】

【化3】

20※シダーゼMを採取することを特徴とするザルコシン・オキシダーゼMの製造法である。

【0012】以下、本発明を詳細に説明する。先ず、本発明酵素の理化学的性質等を以下に示す。

a. 作用

本酵素は、ザルコシンを酸化分解して、グリシン、ホルムアルデヒドと過酸化水素を生成する反応を触媒する酵素である。

【0013】ザルコシン+H₂O + O₂ →グリシン+ホルムアルデヒド+H₂O₂

30 b. 基質特異性

各基質 (0.01M) 0.5 ml、0.3 Mリン酸緩衝液 (pH7.7) 0.1ml、0.2% (W/V) の2, 4-ジクロロフェノール・サルフォネート0.1ml、70mg/dlの4-アミノアンチピリン0.1ml及び70ユニット/mlのペーオキシダーゼ0.1mlを混合したものに、17ユニット/mlの本酵素液及び特公平1-34035号公報実施例記載の耐熱性ザルコシン・オキシダーゼNを夫々0.1ml加え、37°Cで20分間反応させ、1.0Nの酢酸を2ml添加し反応を停止させ、次に反応時間ゼロ時間の反応液を対照として波長510nmでの吸光度値を測定した。なお、相対活性(%)は、N-メチル・グリシン(ザルコシン)を基質として酵素反応させて得られる波長510nmの吸光度を100%とし、他の物質を基質とした場合の比較値(%)で示した。

相対活性(%)

本酵素 特公平1-34035号公報記載の
ザルコシン・オキシダーゼN

100	100
2.5	4.4
1.9	7.7
6.0	25.4

基 質

N-メチルグリシン(ザルコシン)
N-エチルグリシン
N-メチルバリン
N-メチルロイシン

	5	6
N-メチル-イソロイシン	3.2	7.2
N-メチル-フェニルアラニン	0	0
N-メチル-セリン	0	0
N-メチル-グルタミン酸	0	0
N-メチル-リジン	0	0
L-アラニン	0	0
L-セリン	0	0
L-グルタミン酸	0	0
N, N-ジメチル-グリシン	0	0
ベタイン	0	0
コリン	0	0
プロリン	0.3	0.5

c. 至適pH

本酵素の至適pHは、ザルコシンを基質とした場合、図1に示すようにpH8.0~9.0である。図1中、×-×: Na₂HPO₄-クエン酸、○-○: リン酸バッファー、●-●: トリス-塩酸、△-△: TES-NaOH、▲-▲: PSO-NaOH、□-□: Gly-Gly-NaOH、■-■: Gly-NaCl-NaOHである。

d. 力価の測定法

0.2Mのザルコシン溶液0.3mlに、0.3Mのトリス-塩酸緩衝液(pH8.8)0.1ml及び適当な濃度の本酵素液0.1mlを加え、37°Cで、10分間反応させた後、1.0Nの酢酸液0.5mlを添加して反応を停止させ、次に、これにアセチル・アセトン呈色液[アセチル・アセトン0.2% (V/V)、リン酸水素二アンモニウム10% (W/V)](pH6.5)を3ml添加し、37°Cで40分間発色させて、光電比色計により波長410nmにおける吸光度値を測定した。

【0014】そして、予め作製したホルムアルデヒドの検量曲線より、その生成量を調べておき、37°C、1分間当たり1μMのホルムアルデヒドを生成する酵素量を1ユニットとした。

e. 作用適温の範囲

図2に示すように本酵素の作用適温の範囲は、50~60°Cにある。

f. 熱安定性

精製した本酵素を3ユニット含有する酵素液0.5ml[0.3Mトリス-塩酸緩衝液(pH8.0)]を各温度に20分間放置して、残存する酵素活性量を調べた結果、図3に示すように、50°Cにおいて100%、60°Cにおいて64%の残存活性を示した。

g. pH安定性

0.2ユニットの本酵素を含有する各緩衝液0.5mlを5°Cで48時間放置後、残存する酵素活性を調べた。その結果は図4に示すように、pH7.0~10.0である。なお、使用した緩衝液は至適pHを求めたときと同一のものである。

h. 阻害、活性化及び安定化

本酵素は、銅、亜鉛、銀、水銀等のイオン及びSDS(ドデシル硫酸ナトリウム)により強く阻害される。活性化剤及び安定化剤は特にない。

i. 分子量

本酵素の遺伝子の塩基配列から翻訳されるポリペプチドの分子量は、43072である。

【0015】次に、この新規ザルコシン・オキシダーゼM(以下「SOM」という。)をコードする遺伝子を含有するDNAの調製について述べる。SOMをコードする遺伝子のドナー微生物としては、例えバチルス・エスピー。(Bacillus sp.) KS-11Aが挙げられる。バチルス・エスピー。(Bacilluc sp.) KS-11Aは、本発明者が土壤中より新たに分離した菌株であり、その菌学的性質は下記の通りである。

【0016】(a) 形態

顕微鏡的観察(肉汁寒天培地30°C、1~3日間培養)

(1) 細胞の形及び大きさ: 0.8~1.1×3.0~4.5ミクロンの桿菌

(2) 細胞の多形性の有無: 認められない。

(3) 運動性の有無: 周鞭毛で運動する。

【0017】(4) 孢子の有無: 内生孢子は極めてできにくい。

(5) グラム染色性: 陽性。

(6) 抗酸性: 陰性。

(b) 各培地における生育状態

(1) 肉汁寒天平板培養: 30°C、24時間で淡灰褐色コロニー、表面平滑で鈍い光沢を有し、不透明である。色素の生成はない。

【0018】(2) 肉汁寒天斜面培養: 生育は良好で(1)と同じ。

(3) 肉汁液体培養: 静置培養は生育が悪く、生育菌体の沈澱を形成する。

(4) 肉汁ゼラチン穿刺培養: 25°Cで培養して液化する。

(5) リトマスマルク: 変化しない。

【0019】(c) 生理学的性質

(1) 硝酸塩の還元: 陰性

(2) 脱窒反応: 陰性

(3) MRテスト: 陰性

(4) VPテスト: 陰性

(5) インドールの生成: 陰性

(6) 硫化水素の生成: 陰性

- (7) デンプンの加水分解 : 陽性
 (8) カゼインの加水分解 : 陰性
 (9) 尿酸の分解 : 陰性
 (10) チロシンの分解 : 陰性
 (11) セルロースの加水分解 : 陰性
 (12) クエン酸塩の利用 : 陰性
 (13) 無機窒素源の利用 : アンモニアの利用は弱い、硝酸塩は利用しない。

【0020】(14) ウレアーゼ : 陰性
 (15) オキシダーゼ : 陽性

糖類	酸の生成	ガスの生成
(1) L-アラビノース	-	-
(2) D-キシロース	-	-
(3) D-グルコース	+	-
(4) D-マンノース	-	-
(5) D-フランクトース	-	-
(6) D-ガラクトース	-	-
(7) 麦芽糖	-	-
(8) ショ糖	-	-
(9) 乳糖	-	-
(10) トレハロース	-	-
(11) D-ソルビット	-	-
(12) D-マンニット	-	-
(13) イノシット	-	-
(14) グリセリン	-	-
(15) デンプン	-	-

(d) その他の性質

細胞壁中の meso-ジアミノピメリン酸の存在は陽性でキノン系はMK-7であり、DNAのGC含量(%)は37%である。

【0022】カタラーゼ陽性のグラム陽性桿菌で細胞壁のジアミノ酸及びキノン系等の測定よりバチルス属に属する菌株と考えられ、Bacillus circulans の近い菌株であるが、同一とは考えられず、バチルス・エスピー(Bacillus sp.) KS-11A株と命名した。なお、バチルス・エスピー。(Bacillus sp.) KS-11A株は、工業技術院微生物工業技術研究所に、微研条寄第3605号(FERM BP-3605)として寄託されている。

【0023】例えば、バチルス・エスピー. KS-11A株を、特開昭61-162174号公報記載の方法と全く同様にして培養し、培養物を得る。この培養物を、例えば3000r.p.m.以上、好ましくは8000~10000r.p.m.で5分以上、好ましくは10~15分間遠心分離してバチルス・エスピー. KS-11Aの菌体を得る。この菌体より、例えば、カレント・プロトコールズ・イン・モレキュラー・バイオロジー [Current Protocols in Molecular Biology、第1巻、第2号(1987年)] 記載の方法等により染色体DNAを得ることができる。

【0024】次いで、この染色体DNAに、SOM遺伝子上に切断部位を有しない制限酵素、例えばBamH I (宝

- * (16) カタラーゼ : 陽性
 (17) 色素の生成 : 陰性
 (18) 耐塩性 : 5% NaCl で生育しない。
 【0021】(19) 酸素に対する態度 : 好気性
 (20) 生育の範囲 : 生育pH域は6~9、生育温度は22°C~37°C
 85°C、30分間処理で完全に死滅する。
 (21) O-Fテスト : 酸化(グルコース)
 (22) 糖類からの酸及びガスの生成

*10

糖類 酸の生成 ガスの生成

(1) L-アラビノース	-	-
(2) D-キシロース	-	-
(3) D-グルコース	+	-
(4) D-マンノース	-	-
(5) D-フランクトース	-	-
(6) D-ガラクトース	-	-
(7) 麦芽糖	-	-
(8) ショ糖	-	-
(9) 乳糖	-	-
(10) トレハロース	-	-
(11) D-ソルビット	-	-
(12) D-マンニット	-	-
(13) イノシット	-	-
(14) グリセリン	-	-
(15) デンプン	-	-

30 酒造社製) を温度30°C以上、好ましくは37°C、酵素濃度は10~1000ユニット/mlで3時間以上、好ましくは16時間作用させて消化し、種々の染色体DNA断片混合物を得る。このようにして得たDNA断片混合物から、例えば、通常のアガロースゲル電気泳動法により、好ましくは15~20Kb(キロ・ベース・ペア)の大きさのDNA断片混合物を得、これにアルカリ性ホスファターゼ処理等を行なった後、更に、例えばフェノール抽出等の精製手段により精製し、また、更に例えば、エタノール沈澱等の手段により濃縮し、純化されたDNA断片混合物(この中にSOMをコードする遺伝子を含有するDNA断片が含まれる。)を得る。

【0025】一方、本発明において用いることのできる40 ベクターDNAとしては、例えば、バクテリオファージベクターDNA、プラスミドベクターDNA等が挙げられるが、具体的に例えばλEMBL4 DNA [ストラタジーン(STRATAGENE)社製]等が好ましい。上記ファージベクターDNAを、BamH I 断片取り込み可能な状態にするため、例えばBamH I 及びSal I (夫々、宝酒造社製)を、温度30°C以上、好ましくは37°C、酵素濃度10~1000ユニット/mlで1時間以上、好ましくは1~6時間作用させて消化し、更にイソプロパノール沈澱処理等を行なうことにより、BamH I 断片取り込み可能なファージベクターDNAを得る。

【0026】次いで、上記のようにして得たバチルス・エスピーカーKS-11A由来で、SOMをコードする遺伝子を含有するDNA断片混合物と、同じく上記のようにして得たBamH I断片取り込み可能なファージベクターDNAを混合し、これに、例えばT4DNAリガーゼ[ベーリンガー・マンハイム(Boehringer Mannheim)社製]を、温度4~37℃、好ましくは4~16℃、酵素濃度1~100ユーニット/mlで1時間以上、好ましくは6~24時間反応させて組み換え体ファージDNAを得る。

【0027】このようにして得られた組み換え体ファージDNAについては、通常のインビトロ・パッケージング法により、ファージ粒子を形成させることができ、更に、該ファージは、例えば大腸菌P2392(東洋紡より入手)に感染させ、種々のDNA断片を保有する組み換え体ファージのplaquesを得ることができる。このようにして得たplaquesの中より、SOM遺伝子を含むDNA断片を保有する組み換え体ファージを検索するには、例えば、[α -³²P] dCTP [アマシャム・ジャパン(Amersham Japan)より入手]で標識したザルコシン・オキシダーゼN遺伝子(特開平1-668287号公報)をプローブとして、カレント・プロトコールズ・イン・モレキュラー・バイオロジー[Current Protocols in Molecular Biology、第1巻、第6号(1987年)]記載の方法によりplaques・ハイブリダイゼーションを行なうことができる。

【0028】このようにして得られた組み換え体ファージ(その中にSOM遺伝子を含むDNA断片を含有している。)より、純化されたファージDNAを得るには、例えば、モレキュラー・クローニング[Molecular Cloning、第371~372頁、コールド・スプリング・ハーバー・ラボラトリ(Cold Spring Harbor Laboratory)(1982年)]記載の方法により得ることができる。

【0029】そして、以上のようにして得られ、かつ純化された組み換え体ファージDNAの中のSOMをコードする遺伝子を含有するDNAには、SOMをコードする遺伝子以外に不用なDNAが大量に存在するため、以下の操作により該不用なDNAを除去するのである。次いで、このようにして得られ、かつ純化された組み換え体DNAに、SOM遺伝子上に切断部位を有していない制限酵素、例えばBglII、EcoRI等を、温度30℃以上、好ましくは37℃、酵素濃度10~1000ユーニット/mlで1時間以上、好ましくは1~6時間作用させて消化し、DNA断片混合物を得る。

【0030】このようにして得たDNA断片混合物中の、何れのDNA断片にSOMをコードする遺伝子が含有されているかを判定するには、ベーリンガー・マンハイム社製のDNA・ラベリング・アンド・デテクション・キット(DNA Labeling and Detection Kit)を使用し、非放射性のジゴキシゲニンで標識したザルコシン・オキシダーゼN遺伝子(特開平1-168287号公報)をプローブ

として用いることにより、常法にてサザン・ハイブリダイゼーション等を行なうことができる。

【0031】次いで、上記のよう消化して得られたDNA断片混合物について、通常のアガロース電気泳動を行い、例えば、上記のようにしてSOMをコードする遺伝子を含有するものと判定されたDNA断片のみを、フナコシ社製のジーンクリーンIIキット(GENE CLEAN II KIT)を用いて精製し、純化されたBglII消化断片(この中にSOMをコードする遺伝子が含有されている。)を得る。

【0032】一方、本発明において用いることのできるベクターDNAとしては、如何なるものでもよく、例えば、プラスミドベクターDNA、バクテリオファージベクターDNA等が挙げられるが、具体的に例えばプラスミドpUC118、pUC119 DNA[夫々、宝酒造社製]等が好ましい。上記ベクターDNAに、制限酵素、例えばBamH I、EcoRI等(夫々、宝酒造社製)を温度30℃以上、好ましくは37℃、酵素濃度10~1000ユーニット/mlで1時間以上、好ましくは1~6時間作用させて消化し、切断されたベクターDNAを得る。

【0033】次いで、上記のようにして得たバチルス・エスピーカーKS-11A由来で、SOMをコードする遺伝子を含有するDNA断片混合物と、切断されたベクターDNAを混合し、これに例えばT4DNAリガーゼ[ベーリンガー・マンハイム社製]を、温度4~37℃、好ましくは4~16℃、酵素濃度1~100ユーニット/mlで1時間以上、好ましくは6~24時間反応させて組み換え体DNAを得る。

【0034】この組み換え体DNAを用いて、例えば大腸菌K-12、好ましくは大腸菌JM109(宝酒造株より入手)、大腸菌HB101(ATCC 33694)、大腸菌DH1(ATCC 33849)、大腸菌x-1776(ATCC 31244)等を形質転換あるいは形質導入して夫々の菌株を得る。この形質転換はディー・エム・モーリソン(D. M. Morrison)の方法

[メソズ・イン・エンザイモロジー(Methods in Enzymology)、第68巻、第326~331頁(1979年)]により行なうことができる。また形質導入はビー・ホーン(B. Hohn)の方法[メソズ・イン・エンザイモロジー、第68巻、第299~309頁(1979年)]により行なうことができる。

【0035】そして上記菌株よりザルコシン・オキシダーゼ活性を有する菌株をスクリーニングすることにより、SOMをコードする遺伝子の全長を含有するDNA断片をベクターDNAに挿入した組み換え体DNAを含み、SOM生産能を有するエッセリシア属に属する菌株を得ることができる。このようにして得られた菌株より純化された新規な組み換え体DNAを得るには、例えばピー・グーリー(P. Guerry)等の方法[ジェー・バクテリオロジー(J. Bacteriology)、第116巻、第1064~1066頁(1973年)]、ディー・ビー・クレウェル(D. B. C. Lewell)の方法[ジェー・バクテリオロジー、第110巻、

第667～676頁（1972年）]などにより得ることができる。

【0036】上記SOM遺伝子を含有するDNAを用いて、実施例の項目(7)に示すような方法によって、SOM遺伝子の全塩基配列の解析を行ない（配列表の配列番号2参照）、次いで前記塩基配列を有する遺伝子によって翻訳されるポリペプチドのアミノ酸配列を確定する（配列表の配列番号1参照）。このようにして確定されたアミノ酸配列をコードする遺伝子が本発明のSOM遺伝子である。

【0037】次に、上記のようにして得られたSOM遺伝子を含有するDNAをベクターDNAに挿入した組み換え体DNAを含み、SOM生産能を有するエッセリシア属に属する菌株を用いてSOMを生産するには、この菌株を通常の固体培養法で培養してもよいが、なるべく液体培養法を採用して培養するのが好ましい。また、上記菌株を培養する培地としては、例えば、酵母エキス、ペプトン、肉エキス、コーンスティーピリカーアリは大豆もしくは小麦麹の浸出液等の1種以上の窒素源に、リン酸二水素カリウム、リン酸水素二カリウム、硫酸マグネシウム、塩化マグネシウム、塩化第二鉄、硫酸第二鉄あるいは硫酸マンガン等の無機塩類の1種以上を添加し、更に必要により糖質原料、ビタミン等を適宜添加したものが用いられる。

【0038】なお、培地の初発pHは、7～9に調節するのが適当である。また培養は30～42℃、好ましくは37℃前後で4～24時間、好ましくは6～8時間、通気攪拌深部培養、振盪培養、静置培養等により実施するのが好ましい。培養終了後、該培養物よりSOMを採取するには、通常の酵素採取手段を用いて得ることができる。

【0039】例えば、常法により菌体を、超音波処理、磨碎処理などするか、または、リゾチーム等の溶菌酵素を用いて本酵素を抽出するか、またはトルエン等の存在下で振盪もしくは放置して自己消化を行なわせ本酵素を菌体外に排出させる。この溶液を濾過、遠心分離などして固形部分を除去し、必要によりストレプトマイシン硫酸塩、プロタミン硫酸塩あるいは硫酸マンガンにより除核酸した後、これに硫安、アルコール、アセトン等を添加して分画し、沈澱物を採取し、これを水に対し透析した後、真空乾燥して粗酵素標品を得る。

【0040】そして本酵素は、必要により酵素の単離精製の常法に従って、例えば、(1) DEAE-セルロースのカラムクロマトグラフィー、(2) 硫安分画、(3) QAE-セファデックスのカラムクロマトグラフィー、(4) TSK-GE Lブチルートヨーパール650 C〔東洋ソーダ（株）製〕の疎水クロマトグラフィー、(5) セファデックスによるゲル濾過等の方法、またはその他の方法を必要に応じて組み合わせて用いることにより高度に精製されたSOM標品を得ることができる。

【0041】上記精製手段により得られる組み換え体由

来の精製SOMの理化学的性質は、前記したバチルス・エスピーカーKS-11A由來のSOMの理化学的性質と全く同様である。

【0042】

【実施例】以下、実施例により本発明を更に詳細に説明するが、本発明の範囲は、かかる実施例に限定されるものではない。

実施例

(1) バチルス・エスピーカーKS-11A株の染色体DNAの調製

10 バチルス・エスピーカーKS-11A株を、T-Y培地 {1% (W/V) バクトートリプトン (Bacto-trypton) [ディフコ (Difco) 社製]、0.5% (W/V) バクトーイースト・エキストラクト (Bacto-yeast extract) [ディフコ (Difco) 社製]、0.5% (W/V) NaCl} (pH7.2) 200ml に接種し、温度30℃で16時間振盪培養し、培養物を得た。

【0043】この培養物を5000r.p.m.で10分間常法により遠心分離処理し、湿潤菌体0.5gを得た後、該菌体からカレント・プロトコールズ・イン・モレキュラー・バイオロジー [Current Protocols in Molecular Biology, 第1巻、第2号 (1987年)] 記載の方法により染色体DNAを得た。次いで、この染色体DNA 50μg と制限酵素BamH I (宝酒造社製) 50ユニットを20mMトリス塩酸緩衝液 (100mM KC1、10mM MgSO₄ 及び1mMジチオスレイトール含有) (pH8.5) に混合し、温度37℃で16時間反応させた。反応終了液を常法により0.7% (W/V) アガロースゲル (宝酒造社製) 電気泳動処理したものより、およそ15～20Kb (キロ・ベース・ペア) の大きさのDNA断片をアール・シー・エイ・ヤング (R.C.A. Yang) 等の方法 [メソズ・イン・エンザイモロジー (Methods in Enzymology), 第68巻、第176～182頁 (1979年)] により

20 溶出して溶出物を得、これから常法によりフェノール抽出処理し、更にエタノール沈澱処理して、純化されたBamH I 消化断片を得た。これを1ユニットのアルカリ性フオスファターゼ (宝酒造社製)と共に50mMトリス塩酸緩衝液 (pH8.0) に添加し、温度37℃で45分間反応して、5'末端のリン酸を除去した。この反応終了液を常法によりフェノール抽出処理し、更にエタノール沈澱処理することにより、バチルス・エスピーカーKS-11A染色体DNAのBamH I 消化断片混合物 (15～20Kb) (この中にSOMを40 コードする遺伝子を含有するDNA断片が含まれている。) 5μgを得た。

(2) 組み換え体ファージSOM1の作製

λEMBL4ファージDNA [ストラタジーン (STRATAGENE) 社製] 2μg 並びに制限酵素BamH I 及びSal I (夫々、宝酒造社製) を夫々100ユニットずつを50mMトリス塩酸緩衝液 (100mM NaCl、10mM MgSO₄ 及び1mMジチオスレイトール含有) (pH7.5) に混合し、温度37℃で2時間反応させた後、15mMエチレンジアミン・四酢酸 (EDTA) (pH8.0) を添加し、温度70℃にて10分間処理することにより、酵素反応を停止させた。この反応終了液を常

法によりフェノール抽出処理し、更にイソプロパノール沈澱処理によって小さなDNA断片を除去した後、エタノール沈澱処理して、BamH I断片の取り込み可能となつたλEMBL4ファージDNAを得た。

【0044】次いで、このBamH I断片取り込み可能なλEMBL4ファージDNA 1 μg、上記項目(1)で得られたBamH Iで消化されたバチルス・エスピーカーKS-11Aの染色体DNA断片混合物(15~20Kb) 3 μg及び1ユニットのT4 DNAリガーゼ[ベーリンガー・マンハイム社製]を6.6mM MgCl₂、10mMジチオスレイトール及び10mMATPを含有する66mMトリス塩酸緩衝液(pH7.5)に添加し、温度16°Cで16時間反応し、DNAを連結させた。

【0045】次いで、この組み換え体ファージDNA 1 μgを、通常のインビトロ・パッケージング法により、先ずファージ粒子内にとりこませ、ファージとして大腸菌に感染させた後、クロロホルムを加えて菌体を溶かし、50mMトリス塩酸緩衝液(100mM NaCl、8mM MgSO₄・7H₂O及び0.01%(W/V)ゼラチン含有)に溶出させた。このようにして得られた組み換え体ファージの中より、SOM遺伝子を含むBamH I断片を保有する組み換え体ファージを検索するため、[α-³²P] dCTP[アマシャム・ジャパン(Amersham Japan)より入手]で標識したザルコシン・オキシダーゼN遺伝子(特開平1-168287号公報)をプローブとして、カレント・プロトコールズ・イン・モレキュラー・バイオロジー[Current Protocols in Molecular Biology、第1巻、第6号(1987年)]記載の方法によりブラーク・ハイブリダイゼーションを行なった。このプローブとハイブリダイズしたDNAを有するファージがSOM遺伝子を保有する組み換え体ファージであり、これによって、SOM遺伝子を保有する組み換え体λEMBL4ファージ(λSOM1)を得た。

【0046】(3)組み換え体ファージλSOM1 DNAの単離

大腸菌LE392(東洋紡より入手)の培養液1mlを、0.1%(W/V)グルコースと8mM MgSO₄を添加したT-Y培地[1%(W/V)バクトートリプトン、0.5%(W/V)バクトーイースト・エキストラクト、0.5%(W/V)NaCl](pH7.2)30mlに接種し、温度37°Cで2~3時間振盪培養し、これに、(2)で調製したSOM遺伝子を保有する組み換え体ファージλSOM1の平板培養による溶菌液(2.0~2.5×10⁹個のファージを含む)を接種して、LE392が溶菌するまで(3~5時間)温度37°Cで振盪し、更に0.3mlのクロロホルムを加えて15分間振盪した。この溶菌液を8000r.p.m.で15分間常法により遠心分離処理し、その上清に30μgのRNaseと30μgのDNaseを添加して、温度37°Cで、30分間反応した後、その溶菌液と等量の20%(W/V)ポリエチレングリコール(PEG)/2.5MNaClを添加し、0°Cで1時間PEG沈澱処理した。この沈澱物を50mMトリス塩酸緩衝液(100mM NaCl、8mM MgSO₄・7H₂O及び0.01%(W/V)ゼラチン含有)に

溶出し、常法によりフェノール抽出処理し、更にイソプロパノール沈澱処理して、組み換え体ファージλSOM1 DNAを得た。

【0047】(4)組み換え体プラスミドpSOM1の作製
プラスミドpUC119 DNA(宝酒造社製)2.5 μg及び制限酵素BamH I(宝酒造社製)10ユニットを、20mMトリス塩酸緩衝液(100mM KCl、10mM MgSO₄及び1mMジチオスレイトール含有)(pH8.5)に混合し、温度37°Cで4時間反応させて消化液を得、該液を常法によりフェノール抽出及びエタノール沈澱処理した後、1ユニットのアルカリ性フォスファターゼ(宝酒造社製)と共に50mMトリス塩酸緩衝液(pH8.0)に添加し、温度37°Cで45分間反応して、5'末端のリン酸を除去した。この反応終了液を常法によりフェノール抽出処理し、更にエタノール沈澱処理することにより、BamH Iで消化されたプラスミドpUC119 DNAを得た。

【0048】次いで、上記項目(3)で得られた組み換え体ファージλSOM1 DNA 5 μg及びBglIII(宝酒造社製)10ユニットを、50mMトリス塩酸緩衝液(100mM NaCl、10mM MgSO₄及び1mMジチオスレイトール含有)(pH7.5)に混合し、温度37°Cで16時間反応させて消化液を得た。該消化液を0.7%(W/V)アガロースゲル電気泳動したものより約1.5KbのDNA断片のみをフナコシ社製のジーンクリーンIIキット(GENE CLEAN II KIT)を用いて精製し、純化されたBglIII消化断片0.1 μgを得た。なお、該断片は、SOMをコードする遺伝子を含有する約1.5kbのDNA断片である。

【0049】このようにして得たDNA断片0.1 μg、BamH Iで消化されたプラスミドpUC119 DNA 0.1 μg及びT4 DNAリガーゼ[ベーリンガー・マンハイム社製]1ユニットを、66mMトリス塩酸緩衝液(6.6mM MgCl₂、10mMジチオスレイトール及び10mMATPを含有)(pH7.5)に混和し、温度16°Cで16時間反応させてDNAを連結させた。

【0050】次いで、ディー・エム・モーリソン(D.M. Morrison)の方法[メソズ・イン・エンザイモロジー(Methods in Enzymology)、第68巻、第326~331頁(1979年)]で、塩化カルシウム処理した大腸菌JM109(宝酒造(株)より入手)を、上記のようにして得た組み換え体プラスミドDNAで形質転換し、得られた形質転換株を50 μg/mlアンピシリン、0.5mM イソプロピル-β-D-チオガラクトシド及び0.004%(W/V)5-ブロモ-4-クロロ-3-インドリル-β-D-ガラクトシドを、夫々含有するT-Y寒天平板培地を用いて温度37°Cで24時間培養し、白色のコロニーを形成するものがSOMを生産する株であるので、白色のコロニーを形成する大腸菌JM109(pSOM1)を得た。

【0051】このようにして得られたSOM生産能を有する形質転換株である大腸菌(E.coli)JM109(pSOM1)は、工業技術院微生物工業技術研究所に微工研寄

第3604号 (FERM BP-3604) として寄託されている。

(5) 組み換え体プラスミドpSOM1 DNAの単離

バクトートリプトン1% (W/V) 、バクトーイースト・エキストラクト0.5% (W/V) 、及びNaCl 0.5% (W/V) からなるT-Y培地 (pH7.2) 250ml に12.5mgのアンピシリンを添加し、これに大腸菌 (E. coli) JM109 (pSOM1) を接種して、温度37°Cで20~24時間振盪培養し、培養液を得た。

【0052】次いで、この培養液を、常法により5000r.p.m. で10分間遠心分離処理して湿潤菌体を得、これを50mMグルコース及び10mMEDTAを含有する25mMトリス塩酸緩衝液 (pH8.0) 5mlに懸濁した後、更に、これに、リゾチーム25mgを添加し、室温で5分間溶菌して溶菌液を得た。この溶菌液に、1% (W/V) ドデシル硫酸ナトリウムを含む0.2N-NaOH溶液10mlを添加し、0°Cで10分間放置してDNAを変性させた。更に、これに、5M酢酸カリウム-酢酸緩衝液 (pH4.8) 7.5mlを加え、0°Cで10~30分間放置してプラスミドDNAのみを再生させ、常法により9000r.p.m. で20分間遠心分離して抽出液を得、常法によりクロロホルム抽出処理した後、常法によりエタノール沈澱処理し、沈澱物を得た。

【0053】次いで、この沈澱物を通常の減圧乾燥処理したものと1mMEDTAを含有する10mMトリス塩酸緩衝液6ml (pH7.5) に溶解し、これに塩化セシウム6g及び10mg/mlエチジウム・プロマイド0.3mlを添加したものを、常法により50000r.p.m. で20時間、超遠心分離機を用いて平衡密度勾配遠心処理を行ない、組み換え体プラスミドpSOM1 DNAを単離し、更に、n-ブタノールを使用してエチジウム・プロマイドを抽出除去した後、1mMEDTAを含有する10mMトリス塩酸緩衝液(pH7.5) に対して透析を行ない、純化された組み換え体プラスミドpSOM1 DNA (大きさは、約4.7Kb) 100μgを得た。

【0054】(6) 大腸菌 (E. coli) JM109 (pSOM1) によるSOMの生産及び該酵素の分離、精製
1% (W/V) バクトートリプトン、0.5% (W/V) バクトーイースト・エキストラクト、1mMイソプロピル-β-D-チオガラクトシド、及び0.5% (W/V) NaClからなる培地2L (pH7.2) を攪拌式小型培養装置 (いわしや社製) の培養槽に分注し、常法により高圧滅菌処理したものに、上記と同一組成の培地で予め温度37°Cで24時間振盪培養した大腸菌 (E. coli) JM109 (pSOM1) の培養液20mlを接種し、温度37°Cで8時間通気攪拌培養する操作を5回繰り返して湿潤菌体37gを得た。

【0055】この菌体を0.01Mリン酸緩衝液 (pH8.0) 120mlに懸濁し、常法により超音波破碎処理した後、15000r.p.m. で30分間通常の遠心分離処理し、SOMの粗酵素液130ml (3.2ユニット/ml)を得た。このようにして得た粗酵素液に硫酸ストレプトマイシンを用いて除核酸処理を施したものと、温度50°Cで1時間加熱処理を

行なった後、不溶性物質を10000r.p.m. で10分間遠心分離処理して除去した。

【0056】次いで、この粗酵素液を0.01Mリン酸緩衝液で平衡化済みのQAE-セファデックスA-50カラム (1.4×40cm) に吸着させ、0.27M塩化カリウムを含有する0.01Mリン酸緩衝液で洗浄した後、0.37M塩化カリウムを含有する0.01Mリン酸緩衝液を用いて溶出し、SOM含有溶出液を得た。このSOM含有溶出液を、常法により濃縮した後、凍結乾燥することにより純化されたSOM粉末を得た。

【0057】(7) SOM遺伝子を含有するDNAの塩基配列の解析

前記項目(5)で得られたプラスミドpSOM1 DNAに組込んだBgIII断片内の種々の制限酵素切断部位を利用し、図5に示した手順にて、SOM遺伝子の塩基配列の解析を行なった。pSOM1より種々の制限酵素にて切り出した各種DNA断片を、プラスミドpUC118またはpUC119 DNA (夫々、宝酒造社製) のマルチクローニングサイトにクローニングし、得られた組み換え体プラスミドDNAを用いて大腸菌JM109 (宝酒造(株)より入手) を形質転換し、夫々の形質転換株を得た。

【0058】なお、DNAの制限酵素による切断、T4 DNAリガーゼによる連結及び形質転換方法、並びにDNA断片のアガロースゲル電気泳動による単離・精製法は、前記項目(4)に記載の方法に準拠した。このようにして得られた形質転換株に、ヘルペスマージM13K07 (宝酒造社製) を感染させメッシング (Messing) の方法 [メソズ・イン・エンザイモロジー (Methods in Enzymology)、第101巻、第20~78頁 (1983年)] に従い一本鎖DNAを調製した。

【0059】得られた一本鎖DNAによるシーケンシングは、ダイ・プライマー・ターク・シーケンシング・キット (Dye Primer Taq Sequencing Kit) [アプライド・バイオシステムズ (Applied Biosystems) 社製] を用い、上記メッシングの方法に従って行なった。更に、塩基配列の解析のためのゲル電気泳動は、50% (W/V) の尿素を含む、6% (W/V) ポリアクリルアミドゲル (National Diagnostics社製) を用い、DNAシーケンサ 370A (アプライド・バイオシステムズ社製) にて行なった。

【0060】得られたSOM遺伝子の全塩基配列を配列表の配列番号2に、また、該遺伝子から翻訳されるポリペプチドのアミノ酸配列を配列表の配列番号1に示した。

【0061】

【発明の効果】本発明の新規SOMは、ザルコシンに対する高い基質特異性と熱安定性を同時に有しており、クレアチニンあるいはクレアチシンの高感度で特異性の高い酵素的測定法に好適である。更に、本発明SOM遺伝子の組み込まれた新規な組み換え体DNAを含むエッシャリシア属に属する菌株を培地に培養すると、クレアチニ

ン、クレアチン、ザルコシン等を添加使用することなく、SOMを効率よく得ることができるので、本発明は産業上極めて有用なものである。

【0062】

【配列表】

配列番号：1

配列の長さ：387

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：蛋白質

配列：

Met Ser Thr His Phe Asp Val Ile ValVal	10
Gly Ala Gly Ser Met Gly Met Ala AlaGly	20
Tyr Tyr Leu Ala Lys Gln Gly Val LysThr	30
Leu Leu Val Asp Ala Phe Asp Pro ProHis	40
Thr Glu Gly Ser His His Gly Asp ThrArg	50
Ile Ile Arg His Ala Tyr Gly Glu GlyArg	60
Glu Tyr Val Pro Phe Ala Leu Arg AlaGln	70
Glu Leu Trp Tyr Glu Leu Glu Asn GluThr	80
His Asn Lys Ile Phe Thr Lys Thr GlyVal	90
Leu Val Phe Gly Pro Lys Gly Glu SerAsp	100
Phe Val Ala Glu Thr Met Glu Ala AlaAla	110
Glu His Ser Leu Thr Val Asp Leu LeuGlu	120
Gly Asp Glu Ile Asn Thr Arg Trp ProGly	130
Ile Thr Val Pro Glu Asn Tyr Asn Alalle	140
Phe Glu Pro Asn Ser Gly Val Leu PheSer	150
Glu Asn Cys Ile Arg Ser Tyr Arg GluLeu	160
Ala Val Ala Lys Gly Ala Lys Ile LeuThr	170
Tyr Thr Arg Val Glu Asp Phe Glu ValSer	180
Gln Asp Gln Val Lys Ile Gln Thr AlaAsn	190
Gly Ser Tyr Thr Ala Asp Lys Leu IleVal	200
Ser Met Gly Ala Trp Asn Ser Lys LeuLeu	210
Ser Lys Leu Asn Leu Asp Ile Pro LeuGln	220
Pro Tyr Arg Gln Val Val Gly Phe PheAsp	230
Ser Asn Glu Ala Lys Tyr Ser Asn AspVal	240
Asp Tyr Pro Ala Phe Met Val Glu ValPro	250
Lys Gly Ile Tyr Tyr Gly Phe Pro SerPhe	260
Gly Gly Cys Gly Leu Lys Ile Gly TyrHis	270
Thr Tyr Gly Gln Gln Ile Asp Pro AspThr	280
Ile Asn Arg Glu Phe Gly Ala Tyr GlnGlu	290
Asp Glu Ser Asn Leu Arg Asp Phe LeuGlu	300
Lys Tyr Met Pro Glu Ala Asn Gly GluLeu	310
Lys Arg Gly Ala Val Cys Met Tyr ThrLys	320
Thr Pro Asp Glu His Phe Val Ile AspThr	330
His Pro Glu His Ser Asn Val Phe ValAla	340
Ala Gly Phe Ser Gly HIS Gly Phe LysPhe	350
Ser Ser Val Val Gly Glu Val Leu SerGln	360
Leu Ala Thr Thr Gly Lys Thr Glu HisAsp	370
Ile Ser Ile Phe Ser Ile Asn Arg ProAla	380
Leu Lys Gln Lys Thr Thr Ile	

配列番号：2

配列の長さ：1164

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：線状

配列の種類：genomic DNA

起源

生物名：バチルス・エスピー (Bacillus sp.)

株名：KS-11A株

10 配列：

ATG AGT ACA CAT TTT GAT GTG ATT GTTGTT	30
GGA GCA GGA TCA ATG GGA ATG GCT GCAGGG	60
TAC TAT TTA GCA AAA CAA GGA GTC AAAACA	90
TTA TTG GTG GAT GCA TTC GAT CCG CCGCAT	120
ACA GAA GGA AGC CAT CAC GGT GAT ACTCGC	150
ATT ATC CGC CAT GCT TAC GGT GAA GGAAGA	180
GAA TAT GTT CCA TTT GCA CTA AGA GCACAA	210
GAA TTA TGG TAT GAA CTT GAA AAT GAAACA	240
CAC AAT AAG ATT TTT ACA AAA ACA GGCGTT	270
20 CTA GTT TTT GGT CCG AAA GGT GAA TCCGAT	300
TTC GTT GCC GAA ACA ATG GAG GCA GCTGCA	330
GAA CAT TCA TTG ACT GTG GAT TTA CTTGAG	360
GGT GAT GAA ATC AAT ACG CGC TGG CCCGGC	390
ATA ACG GTT CCT GAA AAC TAT AAT GCAATT	420
TTT GAA CCA AAT TCA GGC GTA TTG TTCAGT	450
GAG AAT TGT ATT CGT TCA TAC CGT GAGCTG	480
GCT GTA GCA AAA GGA GCA AAA ATT TTAACA	510
TAT ACT CGT GTT GAG GAT TTT GAA GTTTCT	540
CAA GAC CAA GTT AAA ATC CAA ACG GCAAAT	570
30 GGA TCG TAC ACA GCT GAT AAA TTA ATCGTA	600
AGT ATG GGT GCT TGG AAT AGT AAA CTACTT	630
TCT AAA TTA AAT CTT GAC ATC CCA TTACAG	660
CCA TAC CGC CAA GTT GTA GGA TTT TTTGAT	690
TCT AAT GAA GCA AAG TAC AGC AAT GATGTG	720
GAT TAT CCA GCA TTC ATG GTA GAA GTACCA	750
AAA GGT ATT TAT TAC GGA TTC CCA AGCTTC	780
GGT GGC TGC GGT TTG AAA ATA GGG TATCAT	810
ACG TAT GGT CAA CAA ATC GAC CCT GATACG	840
ATT AAC CGT GAA TTT GGT GCT TAT CAAGAG	870
40 GAT GAA AGT AAT CTT CGC GAT TTC TTGGAA	900
AAA TAT ATG CCA GAA GCA AAT GGC GAGTTA	930
AAA CGA GGC GCA GTC TGT ATG TAC ACGAAA	960
ACA CCA GAT GAA CAT TTC GTG ATT GATACT	990
CAT CCA GAA CAT TCC AAT GTT TTC GTAGCA	1020
GCT GGT TTC TCT GGA CAC GGC TTT AAATTT	1050
TCA AGT GTA GTC GGT GAA GTG TTA AGTCAA	1080
TTA GCG ACA ACA GGT AAA ACA GAA CATGAT	1110
ATT TCA ATT TTC TCA ATA AAT CGT CCTGCT	1140
TTA AAA CAG AAA ACA ACG ATT TAA	

【図1】本酵素の至適pHを示す図。

【図2】本酵素の作用適温の範囲を示す図。

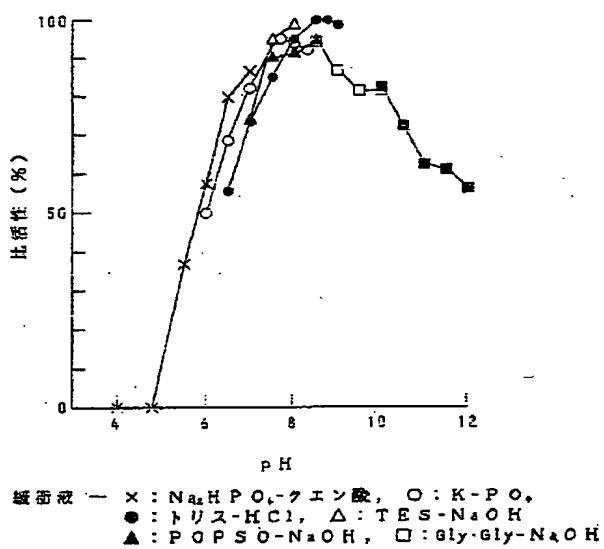
【図3】本酵素の熱安定性を示す図。

【図4】本酵素のpH安定性を示す図。

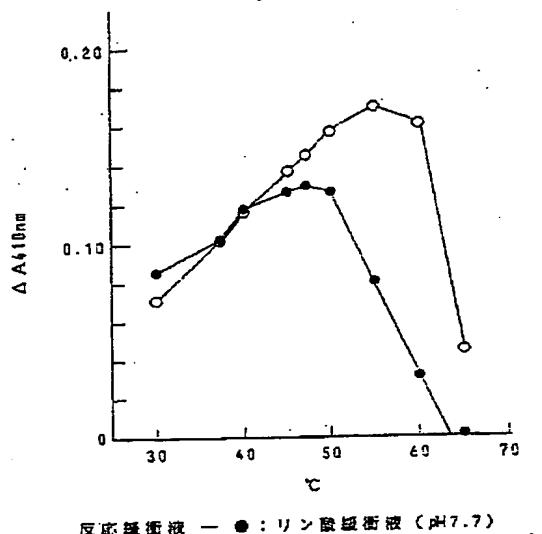
* 【図5】本酵素SOMをコードする遺伝子を含有するDNA断片の主な制限酵素による切断地図を示す図（塩基配列解析の手順付記）。

*

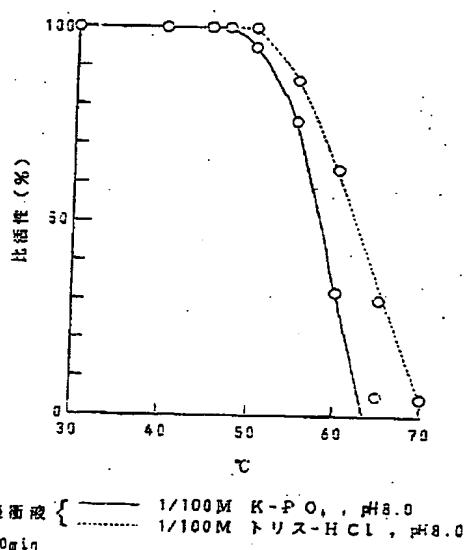
【図1】



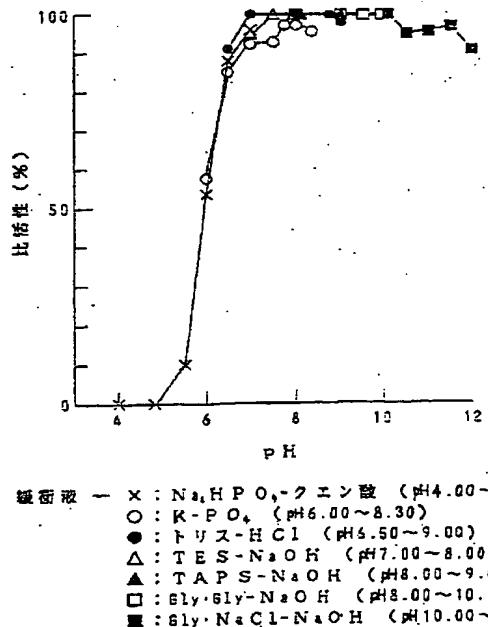
【図2】



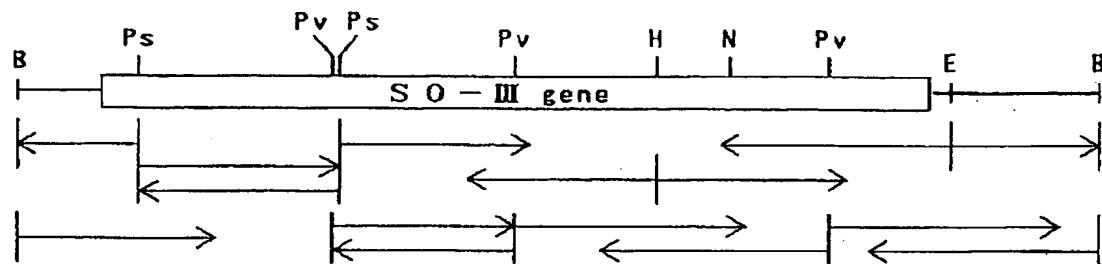
【図3】



【図4】



【図5】



B : *Bgl II* , **Ps** : *Pst I* , **Pv** : *Pvu II* , **H** : *Hind III* , **N** : *Nru I* , **E** : *Eco RI*

フロントページの続き

(51) Int. Cl.⁶ 識別記号 庁内整理番号 F I 技術表示箇所
 C 1 2 R 1:185)
 (C 1 2 N 1/21
 C 1 2 R 1:185)

(72) 発明者 小山 泰二
 千葉県野田市野田339番地 キツコーマン
 株式会社内

(72) 発明者 中野 衛一
 千葉県野田市野田339番地 キツコーマン
 株式会社内